

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 40 13 632 A 1

51 Int. Cl.<sup>5</sup>:  
C07 F 9/09  
A 61 K 9/127  
A 61 K 31/685

21 Aktenzeichen: P 40 13 632.9  
22 Anmeldetag: 27. 4. 90  
43 Offenlegungstag: 31. 10. 91

BEST AVAILABLE COPY

DE 40 13 632 A 1

71 Anmelder:

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der  
Wissenschaften eV, 3400 Göttingen, DE

74 Vertreter:

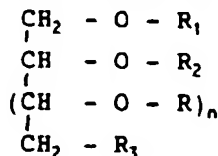
Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys.  
Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B.,  
Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel,  
J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000  
München

72 Erfinder:

Eibl, Hansjörg, Prof. Dr., 3406 Bovenden, DE; Unger,  
Clemens, Dr., 3400 Göttingen, DE

54 Liposomen mit positiver Überschuladung

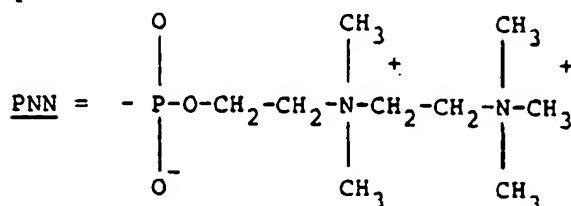
57 Es werden neue Liposomenstrukturen beschrieben, die  
dadurch gekennzeichnet sind, daß sie mindestens 1 Mol-%  
einer eine positive Überschuladung aufweisenden Verbind-  
ung der allgemeinen Formel (I) enthalten



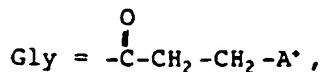
in der

R<sub>1</sub> Alkoyl oder Alkyl mit je 14 bis 18 C-Atomen, Oleoyl oder  
Oleyl bedeutet,

R<sub>2</sub> die gleiche Bedeutung wie R<sub>1</sub> besitzt (R<sub>1</sub> aber nicht gleich  
R<sub>2</sub> sein muß) und außerdem PNN



oder Gly



worin A = -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>

bedeuten kann,

R<sub>3</sub> = -O-R<sub>1</sub>, -O-PNN, -O-Gly, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub><sup>+</sup>, NH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup>  
oder N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup> bedeutet,

R eine der für R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> oder R<sub>3</sub> angegebenen Bedeutungen  
besitzt, und

n eine ganze Zahl von 0 bis 3, und vorzugsweise 0 bedeutet,  
mit der Maßgabe, daß das Molekül eine der genannten  
Gruppen mit positiver Ladung enthält.

Aufgrund ihres organspezifischen Verhaltens eignen sich die  
erfindungsgemäßen Liposomen sehr gut als Arzneistoffträ-  
ger in einer Arzneimittelzubereitung zur Behandlung von  
Erkrankungen im Organ Leber, die ein oder mehrere leberak-  
tive Wirkstoffe in den erfindungsgemäßen Liposomen einge-  
schlossen enthalten.

DE 40 13 632 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft Liposomen mit positiver Überschußladung, die als Wirkstoffträger bei der Behandlung von Lebererkrankungen eingesetzt werden können.

Liposomen sind kugelförmige Gebilde aus einer oder mehreren Lipiddoppelschichten mit wäßrigem Innenraum (Lipidvesikeln). Derartige Bläschen lassen sich durch mechanische Feinstverteilung von Phospholipiden (z. B. Lecithin) in wäßrigen Medien herstellen.

Von Banham et al., J. Mol. Biol. 13 (1965) 238—252, wurde beobachtet, daß Phospholipide in Gegenwart von Wasser Überstrukturen ausbilden. In Abhängigkeit von physikalischen Parametern wie Druck, Temperatur und Ionenkonzentration formen sich Mizellen, unilamellare bzw. multilamellare Liposomen oder auch einfache Lipiddoppelschichten (vgl. Liposomes: From physical structure to therapeutic application (1981), Knight, C. G. (Ed.), Elsevier, North Holland Biomedical Press, Kapitel 2: H. Eibl, Phospholipid synthesis, 19—50; Kapitel 3: F. Szoka und D. Papahadjopoulos, Liposomes; Preparation and characterization, 51—104). Kleine, unilamellare Liposomen sind kugelförmige Gebilde mit einem Durchmesser von 20 bis 200 nm (vgl. Barenholtz et al., FEBS Lett. 99 (1979) 210—214). Ihr Innenvolumen besteht aus Wasser, das durch die Lipiddoppelschicht nach außen abgegrenzt ist. Je nach Lipophilie oder Hydrophilie können Wirkstoffe entweder in der Lipiddoppelschicht oder im wäßrigen Innenvolumen der Liposomen eingeschlossen und im Organismus über die Körperflüssigkeiten transportiert und verteilt werden.

Aufgrund ihrer Struktur dienen Liposomen in der Biochemie und Molekularbiologie als Membranmodelle. In den vergangenen Jahren sind außerdem zahlreiche Arbeiten über die Eigenschaften von Liposomen und ihre Verwendung als Arzneistoffträger veröffentlicht worden (vgl. z. B. H. Schreiner und M. Raeder-Schikorr, Pharmazie in unserer Zeit 11 (1982) 97—108). Bisher publizierte Tierversuche zeigen generell, daß Leber und Milz bezüglich der Aufnahme von Liposomen über andere Organe dominieren. Etwa 8% der Liposomen werden nach einer Stunde und etwa 15% nach 24 Stunden in der Leber vorgefunden. Die Unterschiede in der Organverteilung und in der Organanreicherung zwischen Liposomen, die neutral sind oder solchen, die eine 10%ige negative Überschußladung tragen, sind allerdings gering.

Die mögliche Verwendung von Liposomen in der Medizin zielt im wesentlichen auf die selektive Behandlung von Krankheiten ab. Die gewünschten Wirkungen des in Liposomen eingeschlossenen Wirkstoffes sollen gefördert werden, die unerwünschten Wirkungen dagegen vermindert werden (Verbesserung des therapeutischen Index). Überzeugend ist ein solches Konzept bei der Behandlung einer isolierten Erkrankung, die auf ein bestimmtes Organ beschränkt ist, wobei Lebererkrankungen hierbei eine besondere Bedeutung zukommt. Sofern die eingeschlossenen Wirkstoffe ausschließlich in die Leber gelangen, nicht aber unspezifisch über den gesamten Organismus verteilt werden, wäre die Behandlung des erkrankten Organes eine weitgehend spezifische. Die nachfolgenden zwei Beispiele aus der inneren Medizin verdeutlichen diese Vorstellungen und weisen auf die praktische Bedeutung dieses Prinzips hin:

## Beispiel 1

## Maligne Lebererkrankungen

Bei der Metastasierung von bösartigen Tumoren kann die Leber den Hauptmetastasierungsort darstellen, z. B. im Falle von Brustkrebs oder bei Tumoren des Magen-Darm-Traktes. Die Leber kann aber auch das einzige Metastasierungsorgan darstellen, z. B. beim operierten Dickdarmkrebs, der später zur Lebermetastasierung führt. Demgegenüber sind primäre Leberzellkarzinome ausschließlich auf die Leber beschränkt.

## Beispiel 2

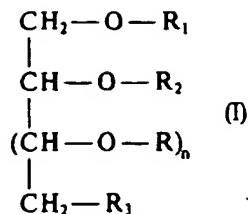
## Entzündliche Lebererkrankungen

Mit den Interferonen (Ifn) steht erstmals eine Substanzgruppe zur Verfügung, die bei der Behandlung der chronischen Virushepatitis erfolgversprechend ist. Der Einschluß von Ifn in Liposomen und deren quantitativer Transport in die erkrankte Leber läßt eine erhebliche Reduktion von Ifn-spezifische Nebenwirkungen erwarten. Außerdem dürften die Zeitintervalle für die Applikation von Ifn wesentlich verlängert werden, möglicherweise kann von einer 4 × wöchentlichen auf eine 1 × wöchentliche Applikation zurückgegangen werden.

Aufgabenstellung der vorliegenden Erfindung ist deshalb die Bereitstellung von Liposomen, mit denen das vorstehend angesprochene Problem eines organspezifischen Wirkstofftransportes gelöst werden kann und mit denen es möglich ist, eine Verbesserung des therapeutischen Index der in den Liposomen eingeschlossenen Wirkstoffe zu erreichen.

Diese Aufgabe wird mit dem Gegenstand der vorliegenden Erfindung gelöst.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind neue Liposomenstrukturen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie mindestens 1 Mol.-% einer positiven Überschußladung aufweisenden Verbindung der allgemeinen Formel (I) enthalten

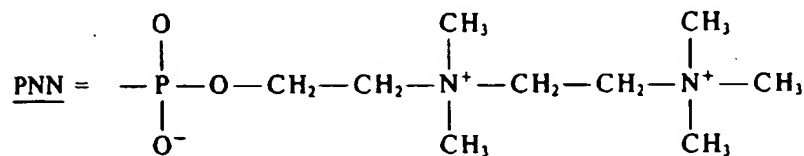


5

in der

R<sub>1</sub> Alkoyl oder Alkyl mit je 14 bis 18 C-Atomen, Oleoyl oder Oleyl bedeutet,R<sub>2</sub> die gleiche Bedeutung wie R<sub>1</sub> besitzt (R<sub>1</sub> aber nicht gleich R<sub>2</sub> sein muß) und außerdem PNN

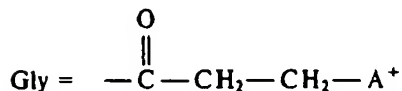
10



15

oder Gly

20



25

worin

A = -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup> bedeuten kann,R<sub>3</sub> = -O-R<sub>1</sub>, -O-PNN, -O-Gly, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub><sup>+</sup>, NH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup> oder N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup> bedeutet,R eine der für R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> oder R<sub>3</sub> angegebenen Bedeutungen besitzt, und

n eine ganze Zahl von 0 bis 3, und vorzugsweise 0 bedeutet, mit der Maßgabe, daß das Molekül eine der genannten Gruppen mit positiver Ladung enthält.

30

Aus der DE-A-27 52 553 sind phospholipidartige Verbindungen und Verfahren zu ihrer Herstellung bekannt, die eine Struktur aufweisen, die mit der vorstehend genannten Formel (I), worin einer der Reste R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> oder R<sub>3</sub> PNN umfaßt, vergleichbar sind.

35

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß Liposomen aus Lipidgemischen, die wenigstens 3 Mol-% einer Verbindung der allgemeinen Formel (I) enthalten, ein organspezifisches Verhalten als Arzneistoffträger zeigen. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Liposomen 1 bis 30 Mol-%, und insbesondere 5 bis 15 Mol-% einer Verbindung der allgemeinen Formel (I), wobei die Liposomen auch Gemische aus einer oder mehreren Verbindungen der allgemeinen Formel (I) enthalten können.

40

Die nachstehende Tabelle 1 zeigt, daß für [<sup>3</sup>H]-Inulin markierte erfindungsgemäße Liposomen die eine positive Überschuladung aufweisende Verbindung der allgemeinen Formel (I) enthalten, der Gehalt an [<sup>3</sup>H]-Inulin im Blut bereits nach einer Stunde auf weniger als 1% zurückgegangen ist. Ein außerordentlich hoher Prozentsatz an [<sup>3</sup>H]-Inulin findet sich dagegen in der Leber: nach 1 Stunde 67%, nach 24 Stunden 54% und nach 72 Stunden immer noch 45%. In Organen wie Lunge, Niere, Herz und Gehirn kann Inulin nicht nachgewiesen werden. Deshalb sind diese Organe in Tabelle 1 nicht aufgeführt. Selbst in der Milz, die als Teil des phagozytierenden Systems Liposomen normalerweise gut aufnimmt, werden Liposomen überraschenderweise nicht gefunden. Dies wird mit der nachstehenden Tabelle 2 verdeutlicht, in der die [<sup>3</sup>H]-Inulinaufnahmen für Blut, Leber und Milz pro g Frischgewicht dargestellt sind.

45

50

55

60

65

Tabelle 1

Vergleich der [ $^3\text{H}$ ]-Inulinaufnahme nach Einschluß in Liposomen verschiedener Oberflächenladung und nach Gabe von freiem [ $^3\text{H}$ ]-Inulin

	Lipide (Mol/Mol)	Zeit (Std.)	Blut (% der applizierten Menge)	Leber	Milz
10	PPGPC/Chol 60/40	1 24 72	59 3 0	11 20 17	3 5 2
15	PPGPC/PPGPG/Chol 50/10/40	1 24 72	64 8 0	7 16 11	1 1 2
20	PPGPC/N <sup>+</sup> /Chol 50/10/40	1 24 72	1 0 0	67 54 45	2 0 0
	freies [ $^3\text{H}$ ]-Inulin	1 24	0,6 0	0 0	0 0

Die Verteilung in den Organen ist in Prozent der applizierten Menge an Inulin angegeben. Für einen großen Dosisbereich (bis 1 mMol pro kg Körpergewicht) ist die Aufnahme an [ $^3\text{H}$ ]-Inulin in NMR-I Mäusen fast linear. Freies Inulin hat den Blutkreislauf bereits nach 1 Stunde verlassen und wird vollständig über die Niere ausgeschieden. Die verschiedenen Abkürzungen bedeuten: Std. = Stunde; PPGPC = 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin; Chol = Cholesterin; PPGPG = 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-sn-1-glycerin, Na<sup>+</sup>-Salz; N<sup>+</sup> = ein positives, zweikettiges Lipid aus der allgemeinen Formel (I).

Tabelle 2

Vergleich der [ $^3\text{H}$ ]-Inulinaufnahme nach Einschluß in Liposomen in Prozent pro g Frischgewicht. Alle anderen Angaben entsprechen denen in Tabelle 1

	Lipide (Mol/Mol)	Zeit (Std.)	Blut (% der appl. Menge pro g Frischgew.)	Leber	Milz
40	PPGPC/Chol 60/40	1 24	26 2	8 15	19 38
	PPGPC/PPGPG/Chol 50/10/40	1 24	35 4	6 13	11 18
45	PPGPC/N <sup>+</sup> /Chol 50/10/40	1 24	0 0	37 31	11 0
	freies [ $^3\text{H}$ ]-Inulin	1 24	0,6 0	0 0	0 0

Aus den in den vorstehend angegebenen Tabellen 1 und 2 angegebenen Werten ist ersichtlich, daß mit den erfindungsgemäßen Liposomen aus zweikettigen lipophilen Strukturen, die eine positive Überschußladung aufweisende Verbindung der allgemeinen Formel (I) enthalten, eine ausschließliche Anreicherung des Wirkstoffs in der Leber möglich ist. Diese überraschende Tatsache kann zur Therapie von Lebererkrankungen ausgenutzt werden.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb auch eine Arzneimittelzubereitung zur Behandlung von Lebererkrankungen in der Leber, die in Liposomen eingeschlossen sind, dadurch gekennzeichnet, daß die Liposomen mindestens 1 Mol-%, vorzugsweise 1 bis 30 Mol-%, und insbesondere 5 bis 15 Mol-%, an eine positive Überschußladung aufweisenden Verbindungen der vorstehenden allgemeinen Formel (I) enthalten, worin R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R und n die vorstehend angegebenen Bedeutungen besitzen. Die eingeschlossene Wirkstoffmenge ist nach oben begrenzt durch die Löslichkeit des Wirkstoffs in Wasser für wasserlösliche Pharmaka.

Weiterer Gegenstand ist auch die Verwendung einer Verbindung der allgemeinen Formel (I) zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Lebererkrankungen, das einen oder mehrere Wirkstoffe gegen Erkrankungen im Bereich der Leber in Liposomen eingeschlossen enthält, und worin die Liposomen mindestens 1 Mol-% einer Verbindung der Formel (I) enthalten.

Die erfindungsgemäße Lipide der allgemeinen Formel (I), die zur Herstellung von erfindungsgemäßen Liposomen zur Anreicherung in der Leber verwendet werden können, lassen sich in drei Gruppen unterteilen:

- A) Phospholipidartige Strukturen, die den natürlicherweise nicht vorkommenden Rest PNN enthalten;  
 B) Glycinester von Glyceriden, die vollständig aus natürlichen Bausteinen aufgebaut sein können und die den Rest Gly enthalten und  
 C) Diacyl- oder Dialkyl- $\omega$ -aminohydrochloride, vorzugsweise Diacyl- oder Dialkyl-propandiol-(1,2)-3-aminohydrochloride, in denen  $R_3$  die vorstehend für die allgemeine Formel (I) angegebenen Bedeutungen besitzt, ausgenommen  $-O-R_1$ ,  $-O-PNN$  und  $-O-Gly$ .

Bevorzugte Lipide sind:

Lipide A:  
 1,2-MM-sn-G-3-PNN, 1,2-PP-sn-G-3-PNN, 1,2-SS-sn-G-3-PNN, 1,2-TeTe-sn-G-3-PNN, 1,2-HeHe-sn-G-3-PNN und 2,2-Occc-sn-G-3-PNN; oder die entsprechenden Phospholipide auf der Basis von 1,3-Diacyl- oder 1,3-Dialkylglycerinen als Ausgangsprodukten.

Lipide B:  
 Verbindungen der Formel (I), worin  $R_1$  und  $R_2$  einen vorstehend für  $R_1$  angegebenen Rest bedeuten und insbesondere die Bedeutung M, P, S, Te, He, Oc wie unter der Gruppe A angegebenen, Oleyl und/oder Oleoyl bedeuten, und  $R_3$  der Rest Gly ist, und vorzugsweise  $R_1$  und  $R_2$  gleiche Reste bedeuten; sowie die von den entsprechenden 1,3-Diacyl- oder 1,3-Dialkylglycerinen als Ausgangsprodukte abgeleiteten Verbindungen der Formel (I), in denen  $R_1$  und  $R_3$  die vorstehend für  $R_1$  angegebene Bedeutung besitzen und  $R_2$  den Rest Gly bedeutet;

Lipide C:  
 Ester und Ether von 1,2-Dihydroxypropylamin, einschließlich der methylierten Formen der allgemeinen Formel (I), worin  $R_1$  und  $R_2$  die vorstehend unter den Lipiden B angegebene Bedeutung besitzen,  $n=0$  ist und  $R_3$  die vorstehend für die allgemeine Formel (I) angegebene Bedeutung besitzt, mit der Ausnahme von  $-O-R_1$ ,  $-O-PNN$  und  $O-Gly$ .

Die Lipide der allgemeinen Formel (I) sind bekannt oder können analog zu bekannten Lipiden mit ähnlicher Struktur unter Verwendung von an sich bekannten Reaktionsschritten dargestellt werden.

Die Verbindungen der Lipidgruppe A können z. B. nach den für derartige Verbindungen in der DE-A-27 52 553 angegebenen Verfahren hergestellt werden.

Die Verbindungen der Lipidgruppe B können durch Acylierung eines entsprechend substituierten Glycerinderivats (z. B. von 1,2-Dialkoyl-sn-glycerin) mit einem durch eine Schutzgruppe substituierten Glycerin, vorzugsweise mit N- $\alpha$ -Z-Glycerin, Abspaltung der Schutzgruppe, insbesondere katalytische Abspaltung der Z-Schutzgruppe und gegebenenfalls nachfolgende Methylierung der Aminogruppe erhalten werden.

Zur Herstellung der Verbindungen der Lipidgruppe C werden zunächst, ausgehend von 3-Halogen-1,2-propandiol, vorzugsweise von 3-Brom-1,2-propandiol, die entsprechenden 1,2-Diester oder Diether hergestellt, was nach an sich bekannten Veresterungs- oder Veretherungsmethoden durchgeführt werden kann; die so erhaltenen 1,2-Dialkyl- oder -Diacylderivate werden dann durch Umsetzung mit Ammoniak oder einem entsprechenden N-Methylamino-, N,N-Dimethylamino- oder N,N,N-Trimethylaminohydrochlorid hergestellt.

Bei den vorstehend angegebenen Herstellungsverfahren für die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) arbeitet man vorzugsweise mit den in den Beispielen zur Herstellung erfindungsgemäßer Verbindungen angegebenen allgemeinen Verfahrensweisen und unter den dort angegebenen Reaktionsbedingungen.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Liposomen mit positiver Überschußladung werden die einzelnen Liposomen-Komponenten, z. B. PPGPC, Chol und  $N^+$ , wobei  $N^+$  eine oder mehrere erfindungsgemäße Lipide der allgemeinen Formel (I) darstellt, in einem geeigneten Lösungsmittel, vorzugsweise unter Erwärmen, gelöst, um eine homogene Vermischung der Komponenten zu erreichen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der feinverteilte Lipidfilm wird mit einer wäßrigen Pufferlösung (als wäßrige Pufferlösung können alle physiologisch verwendbaren Lösungen eingesetzt werden) versetzt. Anschließend wird das Gemisch unter milder Agitation ca. 1 Stunde lang auf einer Temperatur gehalten, die im allgemeinen etwa 5°C über der Hauptumwandlungstemperatur der Lipide liegt, z. B. bei ca. 50°C.

Die vorgetemperte Lipidsuspension wird dann in die Druckzelle einer French-Press (Firma Amico, Silver Spring, USA) überführt. Die French-Press besteht aus einer hydraulischen Presse und einer Standarddruckzelle aus Stahl mit einem maximalen Füllvolumen von 40 ml. Nach Verschließen der Druckzelle wird der Druck auf 20 000 psi erhöht und die Liposomendispersion unter konstantem Druck durch einen schmalen Auslaß gepreßt. Der Vorgang wird mindestens dreimal wiederholt. Nach Zentrifugation der Liposomendispersion (Sorvall RC-5B: 5°C, 30 Minuten bei 27 000 g) wird der Überstand vom Sediment abgehoben. Er enthält die Liposomen, die nun für die verschiedenen Verwendungen und Untersuchungen, z. B. zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Arzneimittelzubereitung (wirkstoffhaltige Liposomen) zur Verfügung stehen. Die erfindungsgemäßen Liposomen können ebenso nach anderen Verfahren hergestellt werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb auch ein Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen Liposomen, die mindestens 3 Mol-% einer eine positive Überschußladung aufweisenden Verbindung der allgemeinen Formel (I), worin  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ , R und n die vorstehend angegebenen Bedeutungen besitzen, enthalten, und das dadurch gekennzeichnet ist, daß man mindestens 3 Mol-% einer Verbindung der allgemeinen Formel (I) zusammen mit den weiteren Liposomen-Komponenten in einer Menge, die zusammen mit der Verbindung der allgemeinen Formel (I) 100 Mol-% ergibt.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (I) werden dabei vorzugsweise in einer Menge von 1 bis 30

Mol-%, und insbesondere von 5 bis 15 Mol-% (Gesamtliposomen = 100 Mol-%) eingesetzt.

Zur Herstellung einer Arzneimittelzubereitung, die einen oder mehrere Wirkstoffe, die in den erfindungsgemäßen Liposomen eingeschlossen sind, enthalten, (Herstellung der wirkstoffhaltigen Liposomen) wird wie folgt verfahren:

5 Zum Einschluß wasserunlöslicher Substanzen wird der Wirkstoff mit den Lipiden in Methylenchlorid oder Chloroform gelöst; daran anschließend wird nach dem vorstehend für die Herstellung der erfindungsgemäßen Leerliposomen beschriebenen Verfahren gearbeitet.

10 Zum Einschluß wasserlöslicher Substanzen wird, wie vorstehend zur Herstellung der Leerliposomen beschrieben, der Lipidfilm mit einer Pufferlösung versetzt, die jetzt aber den wasserlöslichen Wirkstoff enthält. Anschließend wird, wie bei der Herstellung der Leerliposomen beschrieben, weiter verfahren. Der Überstand nach der Zentrifugation enthält zusätzlich zu den gefüllten Liposomen auch den nicht eingeschlossenen wasserlöslichen Wirkstoff. Dieser freie Wirkstoffanteil kann von dem in Liposomen eingeschlossenen Anteil durch Gelchromatographie abgetrennt werden (vgl. Liposomes: From physical structure to therapeutic application (1981), I. c.). Vorzugsweise wird eine Aufkonzentrierung der Liposomen durch Ultrafiltration vorgenommen (Firma Amicon oder Sartorius). Zweckmäßigerweise wird vor der Verwendung der Liposomen eine Sterilfiltration mit Membranfiltern durchgeführt (Firma Sartorius, Porenweiten 0,2 µm).

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb auch ein Verfahren zur Herstellung einer Arzneimittelzubereitung, die einen oder mehrere Wirkstoffe enthält, die in die erfindungsgemäßen Liposomen eingeschlossen sind, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man nach dem Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Liposomen, die mindestens 3 Mol-% einer Verbindung der allgemeinen Formel (I) enthalten, arbeitet, und zum Einschluß wasserunlöslicher Wirkstoffe den Wirkstoff zusammen mit den Lipiden löst und zum Einschluß wasserlöslicher Wirkstoffe den Lipidfilm mit einer wäßrigen Pufferlösung versetzt, die den wasserlöslichen Wirkstoff enthält.

20 Vorzugsweise sollen die Wirkstoffe in die Leber transportiert werden. Es werden vorzugsweise ein oder mehrere Wirkstoffe ausgewählt, z. B. aus der Gruppe der Zytostatika (Hexadecylphosphocholin, 1-Octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholin, 5-Fluorourazil, Epirubicin, Adriamycin, cis-Platinkomplexe, Novantron), aus der Klasse der immunmodulierenden Substanzen (Interferon α, MAF = macrophage activating factor), antimykotisch wirksame Substanzen (Amphotericin B) und Wirkstoffe gegen Protozoenerkrankungen (Malaria, Trypanosomen- und Leishmanien-Infektionen).

30 Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie darauf zu beschränken.

Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich Mengen- und Prozentangaben auf das Gewicht, Temperaturangaben auf die Celsius-Skala.

### Beispiele

#### Beispiele zur Herstellung erfindungsgemäßer Verbindungen der Lipidgruppe A

#### Allgemeine Verfahrensweise

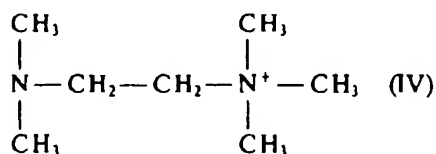
40 Zur Herstellung der Verbindungen geht man so vor, daß man

- a) eine Verbindung der allgemeinen Formel (I), worin R<sub>3</sub> eine OH-Gruppe bedeutet (nachfolgend als Verbindung der allgemeinen Formel (II) bezeichnet) mit POCl<sub>3</sub> in an sich bekannter Weise umsetzt,
- b) das Reaktionsprodukt von Stufe a) in an sich bekannter Weise mit einer Verbindung der allgemeinen Formel (III)



in der Hal Cl, Br oder J bedeutet, umsetzt,

50 c) das Reaktionsprodukt von Stufe b) mit einer Verbindung der allgemeinen Formel (IV)



umsetzt.

60 Unter den Verbindungen der allgemeinen Formel (III) werden die bromhaltigen bevorzugt.

Die Umsetzung von Phosphoroxychlorid mit der Verbindung der allgemeinen Formel (II) in Stufe a) wird vorzugsweise in einem inerten organischen Lösungsmittel durchgeführt. Beispiele für geeignete Lösungsmittel sind halogenierte Kohlenwasserstoffe, wie Chloroform und Tetrachlorkohlenstoff, aromatische Kohlenwasserstoffe, wie Benzol oder Toluol und aliphatische Kohlenwasserstoffe, wie Petrolether und dergleichen. Ebenfalls geeignet sind cyclische organische Lösungsmittel, wie Tetrahydrofuran. Bevorzugt werden Trichlorethylen und Tetrahydrofuran, da hierbei die entstehenden Salze, wie Triethylamin-hydrochlorid, eine sehr geringe Löslichkeit aufweisen und daher ausfallen und durch Abfiltrieren leicht abgetrennt werden können. Die Umsetzung

sollte möglichst unter Feuchtigkeitsausschluß durchgeführt werden. Geeignete Temperaturen liegen im Bereich von  $-10$  bis  $50^{\circ}\text{C}$ , vorzugsweise zwischen  $10$  und  $30^{\circ}\text{C}$ . Je nach den verwendeten Substanzen und Lösungsmitteln kommen jedoch in manchen Fällen auch darüber- und darunterliegende Temperaturen zur Anwendung.

Die Umsetzung wird vorzugsweise in Anwesenheit einer inerten organischen Base, wie Triethylamin, Pyridin oder Chinolin durchgeführt.

Zweckmäßig löst man das Phosphoroxychlorid in dem inerten Lösungsmittel und gibt die Base zu. Dann wird die Verbindung der allgemeinen Formel (II), zweckmäßig ebenfalls in einem inerten Lösungsmittel gelöst, zugesetzt. Dies erfolgt vorzugsweise durch Eintropfen unter Rühren. Da die Umsetzungen glatt und eindeutig verlaufen, kann die Temperatur von Fall zu Fall gewählt werden, daß die Umsetzung direkt nach dem Eintropfen beendet ist, was durch dünnschichtchromatographische Untersuchung leicht festgestellt werden kann.

Die Stufe b) läuft glatt ab, wenn man das Produkt der Stufe a) mit der Verbindung der allgemeinen Formel (III) mischt. Vorzugsweise versetzt man hierzu das Reaktionsgemisch mit einer Lösung der Verbindung der allgemeinen Formel (III) in Gegenwart einer organischen Base, wie Triethylamin. Bevorzugt erfolgt die Umsetzung bei Temperaturen zwischen  $20$  und  $60^{\circ}\text{C}$  unter Verwendung von Tetrahydrofuran als Lösungsmittel. Je nach den angewandten Bedingungen beträgt die Reaktionsdauer im allgemeinen zwischen etwa  $20$  und  $120$  Minuten.

Unter den bevorzugten Bedingungen fällt das Hydrohalogenid der Base aus und wird entfernt. Zur Erzielung bester Ausbeuten wird das Hydrochlorid nachgewaschen und die Waschflüssigkeit der Reaktionslösung wieder zugegeben. Dann wird das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird dann gegebenenfalls in Tetrahydrofuran gelöst und mit einer schwach alkalisch wäßrigen Lösung, beispielsweise Natriumbicarbonat in Wasser, hydrolysiert, wobei vorzugsweise der pH-Wert zwischen  $5$  und  $7$  gehalten wird. Dann wird mit einem organischen Lösungsmittel, wie Diisopropylether oder Chloroform, extrahiert. Man erhält so die Natriumsalze der Alkylphosphatidsäuren, die sich gut umkristallisieren lassen.

Die Reaktion in Stufe c), also die Umsetzung des Produkts von Stufe b) mit der Aminobase, erfolgt ebenfalls im allgemeinen in polaren Lösungsmitteln, wie beispielsweise Chloroform, primäre, sekundäre oder tertiäre Alkohole, Dimethylformamid, Acetonitril, Nitromethan oder Wasser bzw. Gemischen davon. Für die Umsetzung kommen je nach der Empfindlichkeit der verwendeten Ausgangssubstanzen alle Temperaturen im Bereich zwischen dem Festpunkt und dem Siedepunkt des verwendeten Lösungsmittels bzw. Lösungsmittelgemisches in Betracht. Bevorzugt erfolgt die Umsetzung bei Temperaturen zwischen Zimmertemperatur und dem Siedepunkt des Lösungsmittels. So sind bei  $50^{\circ}\text{C}$  die Umsetzungen in der Regel nach  $2$  bis  $8$  Stunden beendet. Das Reaktionsprodukt wird anschließen isoliert und kann umkristallisiert werden. Auch eine chromatographische Reinigung ist möglich. Die Ausbeuten liegen im allgemeinen über  $50\%$  der Theorie, bezogen auf Diglycerid als Ausgangsprodukt.

Die erzielten hohen Ausbeuten an gewünschtem Produkt sind überraschend, da bei den vielen funktionellen Gruppen in den Reaktionspartnern das glatte Ablaufen der Reaktion in der gewünschten Richtung nicht vorhersehbar war.

Die vorstehend angegebenen Verfahrensstufen a), b) und c) werden vorzugsweise wie folgt durchgeführt:

#### Stufe a)

$10$  ml Trichlorethylen und  $6,6$  g  $\text{POCl}_3$  ( $0,044$  Mol) werden in einem Eisbad bei  $0$  bis  $5^{\circ}\text{C}$  mit  $0,04$  Mol eines Alkohols der allgemeinen Formel (II) — gelöst in  $40$  ml Trichlorethylen und  $9$  g Triethylamin — versetzt. Handelt es sich bei dem Alkohol um ein Diacylglycerin, so wird zur Vermeidung von Acylwanderung das Acylierungsgemisch nacheinander mit  $9$  g Triethylamin in  $10$  ml Trichlorethylen und dann sofort mit dem Diacylglycerin in  $30$  ml Trichlorethylen versetzt. Man verwendet  $25$  ml Toluol zum Nachwaschen. Man ersetzt das Eisbad durch ein Wasserbad bei  $20^{\circ}\text{C}$ . Die Reaktion ist schon nach  $20$  Minuten bei  $20^{\circ}\text{C}$  beendet.

#### Stufe b)

Bei  $20^{\circ}\text{C}$  gibt man zu dem Reaktionsgemisch von Stufe a)  $0,048$  Mol Verbindung (III), z. B. gelöst in  $75$  ml Tetrahydrofuran und  $13$  g Triethylamin und verwendet  $25$  ml Tetrahydrofuran zum Nachwaschen. Nach  $20$  Minuten bei  $35^{\circ}\text{C}$  ist die Reaktion abgelaufen. Man filtriert, wäscht in  $50$  ml Toluol nach und engt ein. Die Hydrolyse erfolgt durch Zusatz von nacheinander  $30$  ml Eiswasser, nach  $2$  Minuten  $30$  ml  $1$  M Natriumacetat und nach weiteren  $2$  Minuten  $90$  ml Tetrahydrofuran. Nach  $12$  Stunden ist die Hydrolyse beendet. Es entsteht praktisch nur ein Produkt.

#### Stufe c)

$0,04$  Mol Produkt von Stufe b) ( $\beta$ -Bromethylester) werden in  $90$  ml  $\text{CHCl}_3$  gelöst, mit  $150$  ml Isopropanol sowie mit  $200$  ml  $40\%$  N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin in Wasser versetzt.

Mit dem vorstehend beschriebenen Verfahren werden die nachfolgenden Verbindungen Nr. 1 bis 8 erhalten:

1) 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(N,N-dimethyl-N-[N',N',N'-trimethyl-ethylammonio])ethylammoniumchlorid,

$\text{C}_{40}\text{H}_{82}\text{ClN}_2\text{O}_8\text{P}$  (785,5)

Nachweis durch DC-Vergleich mit dem 1,2-Dipalmitoylderivat (siehe Substanz 2)

2) 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(N,N-dimethyl-N-[N',N',N'-trimethyl-ethylammonio])ethylammoniumchlorid,

$C_{44}H_{90}ClN_2O_8P$  (841.6)

ber. (%):

C 62,79, H 10,78, N 3,33, P 3,68;

gef. (%):

C 62,54, H 10,71, N 3,21, P 3,67.

3) 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-(N,N-dimethyl-N-[N',N',N'-trimethyl-ethylammonio])-ethylammoniumchlorid

$C_{48}H_{98}ClN_2O_8P$  (897.8)

Nachweis durch DC-Vergleich mit dem 1,2-Dipalmitoylderivat (siehe Substanz 2)

4) 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(N,N-dimethyl-N-[N',N'-dimethyl-ethylamino])-ethylammonium

$C_{43}H_{87}N_2O_8P$  (791.2)

ber. (%):

C 65,28, H 11,09, N 3,54, P 3,92;

gef. (%):

C 65,11, H 11,02, N 3,47, P 3,88.

5) 1,2-Dihexadecyl-sn-glycero-3-phospho-(N,N-dimethyl-N-[N',N',N'-trimethyl-ethylammonio])-ethylammoniumchlorid

$C_{44}H_{94}ClN_2O_8P$  (813.7)

Nachweis durch DC-Vergleich mit dem 1,2-Dipalmitoylderivat (siehe Substanz 2)

6) 1,2-Dioleoyl-rac-glycero-3-phospho-(N,N-dimethyl-N-[N',N',N'-trimethyl-ethylamino])-ethylammoniumchlorid

$C_{48}H_{98}ClN_2O_8P$  (865.8)

ber. (%):

C 66,259, H 11,41, N 3,24, P 3,58;

gef. (%):

C 66,41, H 11,35, N 3,19, P 3,45.

7) 1,3-Dihexadecyl-glycero-2-phospho-(N,N-dimethyl-N-[N',N',N'-trimethyl-ethylammonio])-ethylammoniumchlorid

$C_{44}H_{94}ClN_2O_8P$  (813.7)

ber. (%):

C 64,95, H 11,65, N 3,44, P 3,81;

gef. (%):

C 64,79, H 11,59, N 3,42, P 3,69.

8) 1,3-Dioleoyl-rac-glycero-3-phospho-(N,N-dimethyl-N-[N',N',N'-trimethylamino])-ethylammoniumchlorid

ber. (%):

C 66,59, H 11,41, N 3,24, P 3,58;

gef. (%):

C 66,55, H 11,40, N 3,11, P 3,55.

#### Herstellung der Verbindungen der Lipidgruppe B

Zur Herstellung dieser Verbindungen werden die N-geschützten Glycinderivate (N-Z oder N-BOC) in Gegenwart von DCC und Dimethylaminopyridin mit Diacylglycerinen oder Dialkylglycerinen verestert. Die Schutzgruppen werden katalytisch mit Wasserstoff (Pd/C für die Z-Derivate) oder unter sauren Bedingungen (für die BOC-Derivate) entfernt. Die so hergestellten Amine können in N,N-Dimethylderivate oder N,N,N-Trimethylderivate umgewandelt werden (für N,N-Dimethylderivate: Formaldehyd in Gegenwart von Ameisensäure; für N,N,N-Trimethylderivate: durch Permethylierung mit Dimethylsulfat).

Am Beispiel der Herstellung eines 1,2-Dipalmitoyl-sn-3-glycerinderivates wird das Herstellungsverfahren nachstehend beispielhaft erläutert:

#### Acylierung

1,2-Dipalmitoyl-sn-glyceron (0,1 Mol) und N- $\alpha$ -Z-Glycerin (0,12 Mol) werden in 200 ml  $CH_2Cl_2$  gelöst. Bei 20 bis 25°C tropft man unter starkem Rühren eine Lösung aus Dicyclohexylcarbodiimid (0,12 Mol) und 4-Dimethylamino-pyridin (0,02 Mol) in 200 ml  $CH_2Cl_2$  ein. Die Reaktion ist nach 2 Stunden beendet. Man filtriert den Niederschlag (Dicyclohexylharnstoff) ab und rotiert das Filtrat ein. Der Rückstand wird an Kieselgel 60 (Merck 0,2–0,5 mm) chromatographiert. Als Fließmittelsysteme haben sich Gemische aus Hexan/Diisopropylether 10 : 1, 5 : 1, 2 : 1 und 1 : 1 bewährt. Die Ausbeute an 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-glycinester-hydrochlorid betragen 75 bis 85%.

1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-(N- $\alpha$ -Z)-glycinester,

$C_{45}H_{77}NO_8$  (760.11)

ber. (%):

C 71,11, H 10,21, N 1,84, O 16,84;

gef. (%):

C 70,99, H 10,15, N 1,78.



## Katalytische Abspaltung der Z-Schutzgruppe

1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-(N- $\alpha$ -Z)-glycinester (0,5 Mol) werden in 400 ml eines Gemisches aus  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{Eisessig}$  300 : 80 : 20 (V/V) gelöst. Nach Zusatz von 5 g 5%igem Pd/C-Katalysator wird solange in Gegenwart von  $\text{H}_2$  gerührt, bis die  $\text{H}_2$ -Aufnahme aufhört (Aufnahme von ca. 1,2 l  $\text{H}_2$ ). Man extrahiert gegen Wasser und befreit die Chloroformphase vom Lösungsmittel. Der Rückstand kristallisiert nach Zugabe von Aceton. Die Kristalle werden abgesaugt und getrocknet. Mit 1,3-Diacylglycerinen als Ausgangsprodukt können 1,3-Derivate erhalten werden.

Entsprechend wird bei der Herstellung der Dialkylverbindungen verfahren. Ausgangsprodukte sind hier die 1,2-Dialkylglycerine und 1,3-Dialkylglycerine.

## Methylierung der Aminogruppe

Das entsprechende Glycinester-Hydrochlorid (0,05 Mol) wird in 400 ml Dioxan und 100 ml Aminosäure gelöst. Man versetzt mit Paraformaldehyd (1 Mol) und erhitzt 2 Stunden unter Rühren und Rückfluß. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Aceton gefällt. Man erhält 1,2-Dipalmitoyl-sn-3-(N,N-dimethyl)-glycinester-hydrochlorid in Ausbeuten von etwa 85 bis 95%.

## Permethylierung der Aminogruppe

Das entsprechende Glycinester-Hydrochlorid (0,05 Mol) wird in 300 ml 2-Propanol und 100 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. Man versetzt mit Dimethylsulfat (0,2 Mol) und tropft unter Rühren bei 30 bis 40°C eine Lösung von  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0,2 Mol) in 200 ml  $\text{H}_2\text{O}$  ein. Nach Eintropfen wird bei 30°C noch 60 Minuten weitergerührt. Man versetzt mit 500 ml  $\text{CHCl}_3$ , 500 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und 600 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Nach kräftigem Schütteln wird von der Chloroformphase das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mit Aceton versetzt. Die weiße Kristallmasse wird abgesaugt und getrocknet. Beispielsweise beträgt die Ausbeute an 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-(N,N,N-trimethyl)-glycinester-hydrochlorid 90 bis 95%.

Nach diesem Verfahren werden die nachstehend angegebenen Verbindungen Nr. 9 bis 14 hergestellt.

9) 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-glycinester, Hydrochlorid 30

$\text{C}_{37}\text{H}_{72}\text{ClNO}_6$  (662.4)

ber. (%):

C 67,09, H 10,96, N 2,12;

gef. (%):

C 66,98, H 10,93, N 2,14

10) 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-N,N-dimethyl-glycinester, Hydrochlorid 35

$\text{C}_{39}\text{H}_{76}\text{ClNO}_6$  (690.5)

ber. (%):

C 67,84, H 11,10, N 2,03;

gef. (%):

C 67,71, H 10,95, N 2,02

11) 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-N,N,N-trimethyl-glycinester, Chlorid 40

$\text{C}_{40}\text{H}_{78}\text{ClNO}_6$  (704.5)

ber. (%):

C 68,19, H 11,16, N 1,99;

gef. (%):

C 68,07, H 11,10, N 1,87.

12) 1,2-Dihexadecyl-sn-glycero-3-N,N,N-trimethyl-glycinester, Chlorid 45

$\text{C}_{40}\text{H}_{82}\text{ClNO}_4$  (676.6)

ber. (%):

C 71,01, H 12,22, N 2,07;

gef. (%):

C 70,89, H 12,14, N 2,07.

13) 1,3-Dioleoyl-glycero-2-N,N,N-trimethyl-glycinester, Chlorid 50

$\text{C}_{44}\text{H}_{86}\text{ClNO}_4$  (728.6)

ber. (%):

C 72,53, H 11,90, N 1,92;

gef. (%):

C 72,39, H 11,85, N 1,84.

14) 1,3-Dioleoyl-glycero-2-N,N,N-trimethyl-glycinester, Chlorid 55

$\text{C}_{44}\text{H}_{82}\text{ClNO}_6$  (756.594)

ber. (%):

C 69,85, H 10,93, N 1,85;

gef. (%):

C 69,78, H 10,82, N 1,81.

## Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Lipidgruppe C

Die Lipide werden aus 3-Brom-propandiol-(1,2) durch Acylierung in die entsprechenden Diacylverbindungen umgewandelt und dann aminiert. Entsprechende 1,3-Verbindungen werden aus 1,3-Diacylglycerinen in zwei Stufen (Mesylierung, Aminierung) in an sich bekannter Weise erhalten. Verbindungen mit Etherketten werden zweckmäßigerweise in an sich bekannter Weise über 1,2-Dialkyl- oder 1,3-Dialkyl-glycerine erhalten; auch hier erfolgt die Reaktion in zwei Stufen über eine Mesylierung und Aminierung.

Zur Herstellung der 1,2-Dipalmitoyl-Derivate verfährt man beispielhaft wie folgt:

## Dialkoylverbindungen

3-Brom-1,2-propandiol (0,1 Mol), Ölsäure (0,12 Mol) und 4-Dimethyl-aminopyridin (0,02 Mol) werden in 200 ml Tetrahydrofuran gelöst. Bei 10 bis 20°C wird unter kräftigem Rühren eine Lösung von Dicyclohexylcarbodiimid (0,12 Mol) in 200 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  eingetropft. Nach 2 Stunden ist die Acylierung beendet. Man filtriert gebildeten Dicyclohexylharnstoff ab und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Das Produkt wird durch Chromatographie gereinigt (siehe dazu Verbindungen der Gruppe B, Acylierung). Man erhält 3-Brom-dipalmitoyl-propandiol-(1,2) in 85- bis 95%iger Ausbeute.

$\text{C}_{35}\text{H}_{67}\text{BrO}_4$  (631.821)

ber. (%):

C 66,54, H 10,69;

gef. (%):

C 66,46, H 10,61.

## Aminoverbindungen

3-Brom-dipalmitoyl-propandiol-(1,2) (0,1 Mol) wird in 500 ml eines Lösungsmittelgemisches —  $\text{CHCl}_3$ /2-Propanol/25% wäßriger Ammoniaklösung 100 : 400 : 100 (V/V) — für 24 Stunden auf 50°C erwärmt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen und der Rückstand mit 300 ml  $\text{CHCl}_3$ , 300 ml 0,5 N HCl und 400 ml Methanol versetzt. Man schüttelt gut durch und trennt die untere Phase ab. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird an Kieselgel 60 (Merck 0,2—0,5 mm) chromatographiert. Zur Chromatographie werden Lösungsmittelgemische verwendet:  $\text{CHCl}_3$ / $\text{CH}_2\text{OH}$ / $\text{H}_2\text{O}$  500 : 500 : 40 (V/V). Die Ausbeute an 1,2-Dipalmitoyl-propandiol-(1,2)-3-amino-hydrochlorid beträgt etwa 60%, bezogen auf das 3-Bromo-Derivat.

Entsprechend werden N-Methylaminohydrochloride, N,N-Dimethylaminohydrochloride, N,N,N-Trimethylammoniochloride dargestellt, indem 0,1 Mol der Ausgangsverbindung in 600 ml eines Gemisches aus  $\text{CHCl}_3$ /2-Propanol/40%ige wäßrige Methylamin-, Dimethylamin- oder Trimethylamin-Lösung 100 : 400 : 100 (V/V) für 24 Stunden auf 50°C erwärmt werden. Die Aufarbeitung erfolgt wie für den Umsatz mit Ammoniak beschrieben.

In diesem Lösungsmittelgemisch können auch andere Amine zu entsprechenden positiv geladenen Lipiden umgesetzt werden, z. B. Dimethylaminoethanol usw. (siehe dazu auch die Liste der dargestellten Substanzen).

Nach dem vorstehend angegebenen Verfahren wurden die Verbindungen Nr. 15 bis 22 hergestellt.

15) 1,2-Dipalmitoyl-propandiol-(1,2)-3-aminohydrochlorid

$\text{C}_{35}\text{H}_{70}\text{ClNO}_4$  (604.4)

ber. (%):

C 69,55, H 11,67, N 2,32;

gef. (%):

C 69,41, H 11,63, N 2,26.

16) 1,2-Dioleoyl-propandiol-(1,2)-3-N,N,N-trimethylammonium-chlorid

$\text{C}_{42}\text{H}_{80}\text{ClNO}_4$  (698.6)

ber. (%):

C 72,22, H 11,54, N 2,01;

gef. (%):

C 72,03, H 11,48, N 1,89.

17) 1,2-Dihexadecyl-propandiol-(1,2)-3-N,N,N-trimethylammonium-chlorid

$\text{C}_{38}\text{H}_{80}\text{ClNO}_2$  (618.5)

ber. (%):

C 73,79, H 13,04, N 2,27;

gef. (%):

C 73,65, H 13,01, N 2,15.

18) 1,2-Dipalmitoyl-propandiol-(1,2)-3-N,N,N-trimethylammonium-chlorid

$\text{C}_{35}\text{H}_{76}\text{ClNO}_4$  (646.5)

ber. (%):

C 70,60, H 11,85, N 2,17;

gef. (%):

C 70,38, H 11,76, N 2,11.

19) 1,2-Dipalmitoyl-propandiol-(1,3)-3-N,N-dimethylaminohydrochlorid

$\text{C}_{37}\text{H}_{74}\text{ClNO}_4$  (632.5)

ber. (%):

C 70,27, H 11,79, N 2,22; gef. (%): C 70,21, H 11,72, N 2,19. 20) 1,2-Dihexadecyl-propandiol-(1,2)-3-N,N-dimethyl-N-hydroxyethyl-ammonium-chlorid C <sub>39</sub> H <sub>82</sub> ClNO <sub>3</sub> (648.5) ber. (%): C 72,23, H 12,75, N 2,16; gef. (%): C 72,11, H 12,66, N 2,09.	5
21) 1,2-Dioleoyl-propandiol-(1,2)-3-N,N-dimethyl-N-hydroxyethylammonium-chlorid C <sub>43</sub> H <sub>82</sub> ClNO <sub>3</sub> (728.6) ber. (%): C 70,89, H 11,35, N 1,92; gef. (%): C 70,64, H 11,31, N 1,89.	10
22) 1,2-Dioleoyl-propandiol-(1,3)-3-N,N-dimethyl-N-hydroxyethylammonium-chlorid C <sub>43</sub> H <sub>86</sub> ClNO <sub>3</sub> (700.6) ber. (%): C 73,72, H 12,37, N 2,00; gef. (%): C 73,68, H 12,25, N 2,02.	15
	20

#### Herstellung von erfindungsgemäßen Leerliposomen

Es werden die in Tabelle 1 angegebenen erfindungsgemäßen Liposomen PPGPC/N\*/Chol (50/10/40) hergestellt. 25

PPGPC (5 mMol), 1,2-Dihexadecyl-rac-glycero-3-phospho-(N,N-dimethyl-N-[N',N',N'-trimethylethyl-amino])ethyl-ammoniumchlorid (1 mMol) und Cholesterin (4 mMol) werden in 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> oder 50 ml CHCl<sub>3</sub> unter Erwärmen gelöst, um eine homogene Vermischung der drei Komponenten zu erreichen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der feinverteilte Lipidfilm mit 250 ml wäßriger Pufferlösung (es können alle physiologisch verwendbaren Lösungen eingesetzt werden) versetzt. Anschließend hält man das Gemisch unter langsamer Rotation 60 Minuten bei 50° C (im allgemeinen etwa 5° C über der Hauptumwandlungstemperatur der Lipide). 30

Die vorgetemperte Lipidsuspension wird nun in die Druckzelle einer French-Press (Firma Amico, Silver Spring, USA) überführt. Die French-Press besteht aus einer hydraulischen Presse und einer Standarddruckzelle aus Stahl mit einem maximalen Füllvolumen von 40 ml. Nach Verschließen der Druckzelle wird der Druck auf 20 000 psi erhöht und die Liposomendispersion unter konstantem Druck durch einen schmalen Auslaß gepreßt. Der Vorgang wird mindestens dreimal wiederholt. Nach Zentrifugation der Liposomendispersion (Sorvall RC-5B; 5° C, 30 Minuten bei 27 000 g) wird der Überstand vom Sediment abgehoben. Er enthält die Liposomen, die nun für die verschiedenen Experimente zur Verfügung stehen. 35

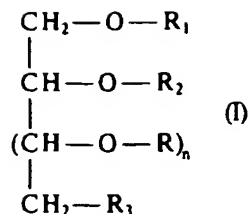
Herstellung von erfindungsgemäßen Liposomen mit einem wasserlöslichen Wirkstoff, der zur Leber transportiert werden soll. 40

PPGPC (5 mMol), 1,2-Dihexadecyl-rac-glycero-3-phospho-(N,N-dimethyl-[N',N',N'-trimethylethyl-amino])ethyl-ammoniumchlorid (1 mMol) und Cholesterin (4 mMol) werden in 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> oder 50 ml CHCl<sub>3</sub> unter Erwärmen gelöst, um eine homogene Vermischung der drei Komponenten zu erreichen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der feinverteilte Lipidfilm mit 250 ml wäßriger Pufferlösung versetzt (es können alle physiologisch verwendbaren Lösungen eingesetzt werden). Anschließend hält man das Gemisch unter langsamer Rotation 60 Minuten bei 50° C (im allgemeinen etwa 5° C über der Hauptumwandlungstemperatur der Lipide). Die vorgetemperte Lipidsuspension wird nun in die Druckzelle einer French-Press (Fa. Amico, Silver Spring, USA) überführt. Die French-Press besteht aus einer hydraulischen Presse und einer Standarddruckzelle aus Stahl mit einem maximalen Füllvolumen von 40 ml. Nach Verschließen der Druckzelle wird der Druck auf 20 000 psi erhöht und die Liposomendispersion unter konstantem Druck durch einen schmalen Auslaß gepreßt. Der Vorgang wird mindestens dreimal wiederholt. Nach Zentrifugieren der Liposomendispersion (Sorvall RC-5B; 5° C, 30 min bei 27 000 g) wird der Überstand vom Sediment abgehoben. Er enthält die Liposomen, die nun für die verschiedenen Experimente zur Verfügung stehen. 45

Zu dieser Lipidsuspension werden 50 ml einer 0,9%igen Lösung von Natriumchlorid gegeben, die MAF (Makrophage Activating Factor) in einer Proteinkonzentration von 70 µg/ml enthält. Dieses Gemisch wird analog zur Herstellung der Leerliposomen in der Druckzelle behandelt. Nach der anschließenden Zentrifugation wird der Überstand vom Sediment abgehoben und einer Gelchromatographie an Sepharose Cl-4B (LKB-Pharmacia, Gelbettlänge 70 cm) unterworfen. Dadurch wird nicht in die erfindungsgemäßen Liposomen eingeschlossener MAF von eingeschlossenem MAF sauber abgetrennt. Letzteres benötigt aufgrund der Größe der Liposomen ein deutlich geringeres Elutionsvolumen als nicht eingeschlossenes MAF (MW 30 000). Die Liposomen werden zur Verwendung aufkonzentriert und steril filtriert. 50

#### Patentansprüche

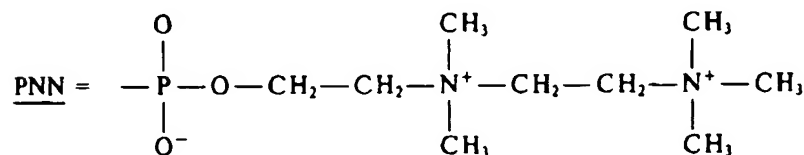
1. Liposomen, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie mindestens 1 Mol-% einer eine positive Überschußladung ausweisenden Verbindung der allgemeinen Formel (I) enthalten 55



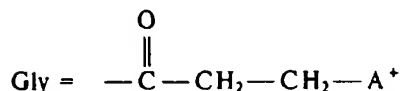
in der

$\text{R}_1$  Alkoyl oder Alkyl mit je 14 bis 18 C-Atomen, Oleoyl oder Oleyl bedeutet,

$\text{R}_2$  die gleiche Bedeutung wie  $\text{R}_1$  besitzt ( $\text{R}_1$  aber nicht gleich  $\text{R}_2$  sein muß) und außerdem PNN



oder Gly



worin

$\text{A} = -\text{NH}_3^+$ ,  $-\text{NH}_2\text{CH}_3^+$ ,  $-\text{NH}(\text{CH}_3)_2^+$ ,  $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$  bedeuten kann,

$\text{R}_3 = -\text{O}-\text{R}_1$ ,  $-\text{O}-\text{PNN}$ ,  $-\text{O}-\text{Gly}$ ,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{NH}_2\text{CH}_3^+$ ,  $\text{NH}(\text{CH}_3)_2^+$  oder  $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$  bedeutet,

$\text{R}$  eine der für  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  oder  $\text{R}_3$  angegebenen Bedeutungen besitzt, und

$n$  eine ganze Zahl von 0 bis 3 bedeutet, mit der Maßgabe, daß das Molekül eine der genannten Gruppen mit positiver Ladung enthält.

2. Liposomen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in Formel (I)  $n$  0 ist.

3. Liposomen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie 1 bis 30 Mol-% einer Verbindung der Formel (I) enthalten.

4. Liposomen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie 5 bis 15 Mol-% einer Verbindung der Formel (I) enthalten.

5. Arzneimittelzubereitung zur Behandlung von Lebererkrankungen, enthaltend einen oder mehrere Wirkstoffe, die zur Leber transportiert werden sollen und in Liposomen eingeschlossen sind,

dadurch gekennzeichnet, daß die Liposomen mindestens 1 Mol-% an eine positive Überschußladung aufweisenden Verbindungen der allgemeinen Formel (I) nach Anspruch 1 enthalten, worin  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}$  und  $n$  die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung besitzen.

6. Arzneimittelzubereitung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß in Formel (I)  $n$  0 ist.

7. Arzneimittelzubereitung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Liposomen 1 bis 30 Mol-% einer Verbindung der Formel (I) enthalten.

8. Arzneimittelzubereitung nach einem der Ansprüche 5–7 dadurch gekennzeichnet, daß die Liposomen 5 bis 15 Mol-% einer Verbindung der Formel (I) enthalten.

9. Verwendung einer Verbindung der in Anspruch 1 angegebenen allgemeinen Formel (I), worin  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}$  und  $n$  die in Anspruch 1 oder 2 angegebene Bedeutung besitzen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen im Bereich der Leber.

10. Verfahren zur Herstellung von Liposomen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens 1 Mol-% einer Verbindung der allgemeinen Formel (I) zusammen mit den weiteren Liposomenkomponenten in einer Menge, die zusammen mit der Verbindung der allgemeinen Formel (I) 100 Mol-% ergibt, in eine Lipidsuspension überführt, die Lipidsuspension vortempert und die so vorgetemperte Lipidsuspension dann durch Pressen und Zentrifugation in an sich bekannter Weise in die Liposomen überführt.

11. Verfahren zur Herstellung einer Arzneimittelzubereitung nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man nach dem Verfahren gemäß Anspruch 10 zur Herstellung der erfindungsgemäßen Liposomen, die mindestens 1 Mol-% einer Verbindung der allgemeinen Formel (I) enthalten, arbeitet, und zum Einschluß wasserunlöslicher Wirkstoffe den Wirkstoff zusammen mit den Lipiden löst, und zum Einschluß wasserlöslicher Wirkstoffe den Lipidfilm mit einer wäßrigen Pufferlösung versetzt, die den wasserlöslichen Wirkstoff enthält.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**